

# Estrutura genética de duas populações naturais de *Bertholletia excelsa* Bonpl. sob exploração no Vale do Rio Acre

Raifanny da Silva Oliveira dos Santos<sup>1\*</sup>, Tatiana Campos<sup>2</sup>, Karina Martins<sup>3</sup>, Lúcia Helena de Oliveira Wadt<sup>4</sup>

1. Bióloga e Mestre em Ecologia e Manejo dos Recursos Naturais (Universidade Federal do Acre, Brasil).

2. Doutora em Genética e Biologia Molecular (Universidade Estadual de Campinas). Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil.

3. Bióloga. Doutora em Agronomia (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo). Professora da Universidade Federal de São Carlos, Brasil.

4. Engenheira Florestal. Doutora em Genética e Melhoramento de Plantas (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz). Pesquisadora da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Brasil.

\*Autora para correspondência: [raifannyso@hotmail.com](mailto:raifannyso@hotmail.com)

## RESUMO

Com a crescente redução das florestas nativas, a sobrevivência e a manutenção das espécies arbóreas dependem de estratégias adequadas de manejo sustentável. Para que essas estratégias sejam efetivas é essencial que estejam embasadas em conhecimentos ecológicos, fisiológicos e genéticos da espécie manejada. *Bertholletia excelsa* é uma espécie modelo para o desenvolvimento sustentável em florestas tropicais. A produção extrativista abastece quase todo o mercado nacional e internacional e é fonte de renda de milhares de famílias na Amazônia. No entanto, poucos estudos têm registrado aspectos genéticos de populações exploradas. O presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a estrutura genética de duas populações exploradas de *Bertholletia excelsa* do vale do Rio Acre. Foram analisados 11 locos microsatélites em adultos e regenerantes. A diversidade gênica ( $H_e$ ) variou de 0,531 a 0,585 e não foi diferente entre as gerações. Os índices de fixação não diferiram significativamente de zero. A divergência genética foi baixa entre os adultos ( $\theta_p = 0,026$ ) e relativamente maior entre os regenerantes ( $\theta_p = 0,070$ ). Os resultados mostram que não há indícios de que a coleta de frutos e sementes tem influenciado negativamente a diversidade genética destas populações.

**Palavras-chaves:** Estrutura genética, populações naturais, castanheira, microsatélites.

## Genetic structure of two exploited populations of *Bertholletia excelsa* Bonpl. in the Acre River valley

## ABSTRACT

Considering the current reduction in forest cover, the survival and maintenance of tree species depend on appropriate strategies for sustainable management. This requires ecological, physiological and genetic knowledge. *Bertholletia excelsa* is a model species for tropical forests sustainable development. The extractive production of Brazil nuts supplies almost completely national and international market and it is source of income for thousands Amazon's families. However, few studies have reported genetic aspects of exploited populations. This study aimed to evaluate the genetic structure of two *Bertholletia excelsa* populations exploited in the Acre River Valley. We analyzed 11 microsatellite loci in adults and saplings. The gene diversity ( $H_e$ ) ranged from 0.531 to 0.585 and it was not different between size classes. The inbreeding coefficient did not differ from zero. The genetic diversity was low among adults ( $\theta_p = 0,026$ ) and relatively higher among regenerating ( $\theta_p = 0,070$ ). Our findings show that there is no evidence that the collection of fruits and seeds has negatively influenced the genetic diversity in these populations.

**Keywords:** Genetic structure; natural populations; Brazil nut; microsatellites.

## Introdução

Dentre os inúmeros produtos florestais não madeireiros (PFNMs) comercializados na Amazônia, *Bertholletia excelsa*, popularmente conhecida como castanheira, é considerada como espécie símbolo. Milhares de famílias vivem da coleta dos seus frutos. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, no ano de 2013, a produção de castanha-do-brasil contribuiu com mais de 70 milhões de reais na produção primária florestal brasileira (IBGE, 2013). Pela falta de plantios comerciais, a produção extrativista é responsável pelo abastecimento de quase todo o mercado nacional e internacional de castanha-do-brasil. Este fato faz com que esta espécie seja um modelo para o desenvolvimento econômico aliado à conservação das florestas tropicais (WADT et al., 2008).

*Bertholletia excelsa* é a única espécie do gênero, pertencente à família Lecythidaceae. Ocorre naturalmente na bacia Amazônica e Guianas, geralmente em maciços denominados de castanhais (PRANCE; MORI, 1979) ou em extensas áreas com menor densidade (WADT et al., 2005). É uma espécie de grande porte, vida longa e que ocupa o dossel na floresta (MORI; PRANCE, 1990).

A castanheira é monóica, auto-incompatível e se reproduz por alopolinização (O'MALLEY et al., 1988; CAVALCANTE, 2012; WADT et al., 2015). A polinização de suas flores é feita por polinizadores específicos: abelhas de grande porte pertencentes principalmente aos gêneros *Bombus* e *Xylocopa* (MAUÉS, 2002; CAVALCANTE, 2012) e o desenvolvimento do fruto leva cerca de 14 meses para a maturação (MORITZ, 1984). A dispersão primária dos frutos ocorre por barocoria, sendo que as sementes permanecem dentro do fruto até serem retiradas por dispersores/predadores (PRANCE; MORI, 1979).

Os principais animais relacionados com a dispersão ou predação das sementes de castanha-do-brasil são cutia (*Dasyprocta* spp.), cuti-

ara (*Myoprocta pratti*), paca (*Cuniculus paca*), algumas espécies de macacos, pequenos ratos silvestres (ZUIDEMA, 2003; SILVA, 2009; HAUGAASEN et al., 2010), além do ser humano quando de sua exploração extrativista. A germinação das sementes e desenvolvimento da planta é totalmente dependente de sua remoção de dentro dos frutos, processo que ocorre naturalmente em um período de 12 a 18 meses (KAINER et al., 1998).

Apesar da coleta extrativista da castanha-do-brasil ser realizada há mais de um século, poucos são os estudos relativos à genética desta espécie. Como uma espécie que gera um produto florestal não-madeireiro de interesse econômico, a manutenção de suas populações depende de estratégias adequadas para o manejo das mesmas (AZEVEDO, 2007). Para que essas estratégias sejam efetivas é essencial que estejam embasadas em estudos genéticos que quantifiquem a variabilidade genética existente dentro e entre as populações (OLIVEIRA et al., 2006). Desta forma, o presente estudo foi realizado com o objetivo de avaliar a estrutura genética de duas populações exploradas de *Bertholletia excelsa* do vale do Rio Acre, Brasil.

## Material e Métodos

### Área de estudo

O estudo foi realizado no período de 2009 a 2010 em dois castanhais nativos com diferentes intensidades de coleta de castanha (ver detalhes em WADT et al., 2008). Um deles está localizado no Seringal Filipinas, Colocação Rio de Janeiro, na Reserva Extrativista Chico Mendes, denominado aqui como Filipinas. O outro está localizado no Seringal Cachoeira pertencente ao Projeto de Assentamento Extrativista Chico Mendes, denominado neste estudo

como Cachoeira. Cada local foi considerado uma população, com distância linear de aproximadamente 30 km entre eles (Figura 1).

Tanto no Filipinas quanto no Cachoeira foram utilizadas três unidades amostrais (UA) de 9 ha (300 x 300 m) estabelecidas por Wadt et al. (2008), onde foi feita a amostragem de indivíduos reprodutivos (adultos) e regenerantes. Nas análises estatísticas as parcelas foram consideradas subpopulações dentro de populações, totalizando seis subpopulações analisadas, cujas localizações são CAC1: 68W23'20", 10S50'07"; CAC2: 68W23'43", 10S49'22"; CAC3: 68W24'27", 10S50'45"; FIL1: 68W39'50", 10S47'06"; FIL2: 68W39'27", 10S47'07"; FIL3: 68W39'47", 10S46'40".



**Figura 1.** Localização das áreas estudadas e das parcelas (300 x 300 m) dentro de cada área. / **Figure 1.** Location of the studied areas and the plots within each area.

#### Amostragem e coleta de material vegetal

Para aumentar a amostragem dos indivíduos adultos ( $DAP \geq 30$  cm com sinais de reprodução), as parcelas foram analisadas com uma extensão de 100 m além da delimitação original. Logo, a área para amostragem de adultos em cada parcela foi de 25 ha (500 x 500 m). Todos os adultos foram identificados com placa de alumínio e tiveram dados de posição geográfica (usando GPS 76CXS Garmin) e diâmetro à altura do peito (DAP), em cm, anotados, além da coleta de uma amostra de câmbio caular para extração de DNA. As amostras de câmbio foram colocadas imediatamente após a coleta em microtubos contendo tampão de transporte (300  $\mu$ l de tampão CTAB 2%; 700  $\mu$ l de etanol absoluto) e mantidas em gelo até armazenamento no laboratório em freezer -20°C.

Para amostragem dos regenerantes ( $DAP < 10$  cm), cada UA foi subdividida em subparcelas de 25 m x 25 m e utilizadas 36 subparcelas por UA para coleta e mapeamento de todos os regenerantes. Essa amostragem foi feita a cada ano no período de 2007 a 2010 onde foram coletados dados de posição geográfica (usando o mesmo GPS) e diâmetro à altura do solo (DAS), em cm, além de amostras de folhas para extração de DNA.

#### Extração e quantificação de DNA

As análises genéticas foram realizadas no Laboratório de Morfogênese e Biologia Molecular da Embrapa Acre. A extração do DNA genômico foi feita de acordo com o protocolo CTAB, descrito por Doyle e Doyle (1987) utilizando macerador automático (Tissue Lyser - Qiagen). A quantificação do DNA extraído foi feita em gel de agarose (1%), corado com brometo de etídio, por meio da comparação das amostras com DNA  $\lambda$  padrão (Life Technologies).

#### Genotipagem com marcadores microssatélites

Foram testados 21 locos microssatélites, dos quais nove foram desenvolvidos por Azevedo et al. (2008) e 12 descritos por Reis et al. (2009). O volume final de cada reação de PCR foi de 13  $\mu$ l, composto por: DNA genômico (5,0 ng), tampão de reação da PCR (10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl), BSA (0,25 mg/ml),  $MgCl_2$  (1,5 mM), dNTPs (0,25 mM), iniciadores direto e reverso (0,27  $\mu$ M), 1 U *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) e água ultrapura estéril. As reações de PCR foram realizadas em termociclador MJ 96+ da Biocycle seguindo o protocolo descrito por Don et al. (1991).

Após a amplificação, os fragmentos de DNA foram separados em gel desnaturante de poliácridamida (5%) corado com nitrato de prata (CRESTE et al., 2001). O tamanho dos alelos foi determinado por comparação com um marcador de peso molecular padrão (10-pb ladder - Life Technologies). Fragmentos amplificados de diferentes tamanhos foram considerados alelos diferentes.

#### Análise dos dados

Para a análise da diversidade genética foram obtidas as estimativas das frequências alélicas juntamente com o número médio de alelos por loco ( $A$ ), e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ). A verificação da presença de alelos nulos foi obtida no programa MICRO-CHECKER, versão 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). O índice de fixação ( $f$ ) e os valores de divergência genética ( $\theta_p$ ) entre populações e subpopulações foram obtidos considerando adultos e regenerantes separados. Ambos os valores foram calculados pelo método de Weir e Cockerham (1984). Estas análises, assim como os parâmetros de diversidade, foram realizadas com o uso do programa FSTAT, versão 2.9.3.2 (GOUDET, 1995).

A aderência das frequências gênicas e genotípicas ao modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi testada usando o teste exato de Fisher e também foi feito teste de desequilíbrio de ligação (DL) entre todos os pares de locos. Ambos os testes foram obtidos com o programa GDA (LEWIS; ZAYKIN, 2000).

A distância genética de Nei (1978) foi calculada entre as subpopulações, utilizando o programa TFPGA 1.3 (MILLER, 1997) e com os resultados dessas distâncias foi construído um dendrograma tendo como método de agrupamento o UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*). Com este mesmo software foi calculada a consistência dos nós do dendrograma por 10.000 reamostragens sobre os locos. Para determinar o ponto de corte do dendrograma e definir o número de grupos foi utilizado o método de Mojena (1977). Adotou-se  $k=1,25$  como regra de parada na definição do número de grupos, como sugerem Milligan e Cooper (1985).

O software Structure 2.3.3 foi utilizado para verificar a presença de diferentes *pools* gênicos compartilhados pelas amostras e o arranjo da estruturação genética das populações (PRITCHARD et al., 2000). Essa análise considera a separação do número total de indivíduos analisados em agrupamentos (*clusters*), atribuindo-lhes um valor K que representa o número de *pools* gênicos diferentes, assumindo equilíbrio de Hardy-Weinberg e ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados dentro de cada população. Dessa forma, são definidos os agrupamentos de indivíduos que compartilham o mesmo *pool* gênico, sem a necessidade da informação prévia sobre sua origem. O valor mais apropriado de agrupamentos (definido pelo valor de K) foi estimado de acordo com Evanno et al. (2005).

## Resultados

### Diversidade genética e índice de fixação

Dos 21 locos testados, apenas 11 (52,4%) foram polimórficos e utilizados nas análises. Foram encontrados 58 alelos no total. O número médio de alelos por loco variou de 4,81 a 5,09. Não houve diferença estatística na média de alelos por loco e riqueza alélica para as gerações analisadas (adultos e regenerantes). A heterozigiosidade esperada variou de 0,531 a 0,585 sendo que, para este parâmetro, não foram detectadas diferenças entre gerações dentro de um mesmo local e nem entre locais. As estimativas de  $f$  não foram significativamente diferentes de zero, a julgar pelo intervalo de confiança (Tabela 1).

**Tabela 1.** Parâmetros de diversidade genética estimados em indivíduos adultos (AD) e regenerantes (REG) de *B. excelsa* com 11 locos microsatélites nas populações Filipinas (FIL) e Cachoeira (CAC). / **Table 1.** Parameters of genetic diversity estimated in adults (AD) and saplings (REG) of *B. excelsa* with 11 microsatellite loci in Filipinas (FIL) and Cachoeira (CAC) populations.

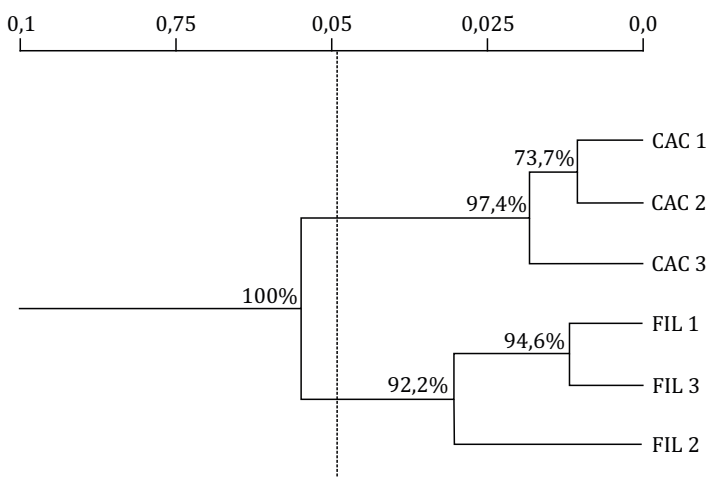
Local	Classe	N	A	$R_s$	$H_e$	$f(IC_{99\%})$
FIL	AD	55	4,81 (0,64)	4,80 (0,64)	0,531 (0,06)	-0,053 (-0,229;0,153)
	REG	68	5,09 (0,70)	4,80 (0,63)	0,585 (0,05)	-0,012 (-0,253;0,082)
CAC	AD	123	5,00 (0,75)	4,96 (0,73)	0,585 (0,05)	-0,013 (-0,121;0,054)
	REG	38	4,90 (0,65)	4,87 (0,64)	0,567 (0,07)	-0,095 (-0,005;0,215)

Tamanho amostral (N); número médio de alelos por loco (A); riqueza alélica ( $R_s$ ); heterozigiosidade esperada ( $H_e$ ) e índice de fixação ( $f$ ). Erros-padrão entre parênteses e  $IC_{99\%}$ : Intervalo de confiança a 99% de probabilidade, obtido por *bootstraps*. Sample size (N); average number of alleles per locus (A); allelic richness ( $R_s$ ); expected heterozygosity ( $H_e$ ) and fixation index ( $f$ ). Standard errors in brackets and  $IC_{99\%}$ : confidence intervals at 99% of probability, obtained by bootstraps.

As probabilidades do teste exato de Fisher mostraram desvios significativos (significância de 1%) nas proporções esperadas para o Equilíbrio de Hardy-Weinberg em dois locos (*Bet 09* e *Bex 02*). A presença de alelos nulos foi evidenciada apenas no loco *Bet 09*.

### Estrutura genética

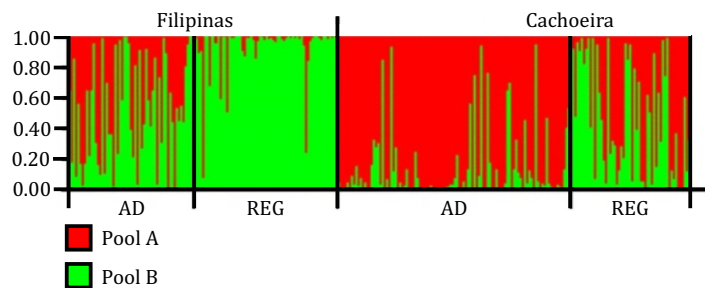
Na análise de agrupamento pelo método UPGMA, usando estimativas de distância genética de Nei (1978) e o método de Mojena (1977), as seis subpopulações foram agrupadas em dois grupos ( $\theta_k = 0,0480$ ) os quais corresponderam às duas populações estudadas (Figura 2).



**Figura 2.** Dendrograma das seis subpopulações obtidos pelo método UPGMA, a partir das distâncias genéticas de Nei e 11 locos microsatélites. Valores de *bootstrap* com 10.000 reamostragens. / **Figure 2.** Dendrogram of six subpopulations obtained from UPGMA using Nei distance and 11 microsatellite loci.

Em relação à divergência genética entre as gerações dentro de populações, observou-se maior divergência entre regenerantes ( $\theta_r = 0,070$ ; IC.: 0,112 a 0,035) do que entre adultos ( $\theta_p = 0,026$ ; IC.: 0,037 a 0,016). Na população do Cachoeira não houve divergência genética entre as classes de tamanho ( $\theta_p = 0,014$ ; IC.: 0,050 a -0,003), enquanto que no Filipinas houve ( $\theta_p = 0,047$ ; IC.: 0,132 a 0,008).

A análise bayesiana da composição de *pools* gênicos evidenciou a presença de dois *pools* para as populações estudadas (Figura 3).



**Figura 3.** Resultados do teste de atribuição de população, com amostras ordenadas por população,  $K = 2$ . / **Figure 3.** Results from the population assignment test in structure, with samples ordered by population:  $K = 2$ .

## Discussão

Apesar da grande riqueza encontrada na Floresta Amazônica, ainda são enormes as lacunas sobre a ecologia e genética das espécies. Estudos genéticos são importantes para o entendimento dos efeitos da fragmentação de habitats sobre a dinâmica e manutenção das populações, além de fornecerem elementos para elaboração de estratégias de manejo, conservação e melhoramento adequadas a cada espécie (KAGEYAMA et al., 2001).

A quantidade de alelos encontrados nas duas populações estudadas foi inferior a outras espécies arbóreas estudadas com o mesmo tipo de marcador. Em consequência disso, os valores de diversidade gênica ( $H_e$ ) encontrados foram relativamente menores aos citados para outras espécies arbóreas tropicais (CLOUTIER et al., 2006; ANDRE et al., 2008; LACERDA et al., 2008; SEBBENN et al., 2011) e corroboram com resultados de outros estudos realizados com a castanheira (BUCKLEY et al., 1988; KANASHIRO et al., 1997; SUJII et al., 2015).

Como não houve diferença significativa entre o  $H_e$  número médio de alelos por loco e riqueza alélica de adultos e regenerantes, considera-se que a diversidade genética está sendo mantida nestas populações ao longo das gerações. Neste contexto, não há indícios de que a coleta de frutos e sementes tem influenciado negativamente na manutenção da diversidade genética destas populações.

A falta de endogamia, devido ao sistema reprodutivo ( $f$ ) observada tanto para os regenerantes como para os adultos foi coerente com a biologia reprodutiva da espécie alógama e auto incompatível (O'MALLEY et al., 1988; CAVALCANTE et al., 2012).

A análise de agrupamento indicou alta relação de similaridade entre as subpopulações, embora as duas populações tenham formado grupos distintos. Baixos valores de divergência genética entre populações de castanheira também foram encontrados em estudos anteriores (BUCKLEY et al., 1988; PARDO, 2001; KAGEYAMA et al., 2004; SUJII et al., 2015; GRIBEL et al., 2007).

As estimativas de divergência genética ( $\theta_p$ ) entre cada par analisado (adultos x adultos entre população, regenerantes x regenerantes entre população, adultos x regenerantes dentro de população) foram baixas, porém significativas de acordo com o intervalo de confiança. Somente entre adultos e regenerantes do Cachoeira a divergência genética não foi significativa.

Apesar de a análise Bayesiana mostrar que as duas populações compartilham os mesmos *pools* gênicos, observou-se que a distribuição destes *pools* dentro de cada população foi distinta. No Cachoeira, houve predominância do *pool* A enquanto que no Filipinas o que predominou foi o *pool* B. Também se verificou que no Filipinas a classe de regenerantes apresentou um padrão distinto dos adultos, o que foi comprovado pela análise de divergência ( $\theta_p = 0,047$ ) entre as classes de tamanho nesta população.

Este resultado de divergência genética entre as classes de tamanho de uma mesma população sugere mudança na estruturação genética ao longo das gerações, o que pode ser um efeito da coleta de sementes, de fluxo gênico ou do sistema reprodutivo da espécie (HAMRICK, 1982). No entanto, Wadt et al. (2008) avaliaram aspectos da estrutura populacional de *B. excelsa* nestes dois locais (mesmas parcelas de estudo), e verificaram menor densidade de castanheiras (árvores mais distantes uma das outras), menor intensidade de coleta dos frutos e



maior taxa de regeneração no Filipinas quando comparado ao Cachoeira, o que se leva a imaginar uma baixa diferenciação entre as classes de tamanho desde que a dinâmica de regeneração é mais ativa que no Cachoeira. Por outro lado, Sujii et al. (2015), estudando a estrutura genética desta espécie em diferentes populações distribuídas na Bacia Amazônica, verificaram uma pequena estruturação genética nas populações do estado do Acre e não descartaram a hipótese de tempo insuficiente para diferenciação entre populações e sugeriram que o processo de diferenciação local ainda está em curso. Talvez estas questões possam explicar os resultados obtidos no presente estudo podendo ser que os dois castanhais avaliados tenham idades diferentes e estejam em processos de adaptação distintos.

De acordo com os resultados, considera-se que nessas populações a coleta de frutos da castanheira não está impactando negativamente a estrutura genética dos castanhais. No entanto, ainda há carência de estudos mais abrangentes e completos, especialmente para identificar os efeitos da história demográfica e da seleção natural nas populações de castanheiras.

## Conclusão

Os marcadores microssatélites foram eficientes para acessar a variabilidade genética das populações naturais de castanheira estudadas. As estimativas genéticas indicaram uma estreita base genética entre as populações, devido à baixa variabilidade encontrada. Não foi detectado efeito da diminuição da diversidade genética nos regenerantes, pois houve a perpetuação dos alelos encontrados nos indivíduos adultos. Tal fato evidencia que a coleta de frutos não tem causado a diminuição da variabilidade genética.

## Referências Bibliográficas

- ANDRE, T.; LEMES, M. R.; GROGAN, J.; GRIBEL, R. Post-logging loss of genetic diversity in a mahogany (*Swietenia macrophylla* King, Meliaceae) population in Brazilian Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 340-345, 2008.
- AZEVEDO, V. C. **Desenvolvimento e aplicações de microssatélites, análise de cpDNA e modelagem computacional para estudos da estrutura e dinâmica genética de maçanduba - *Manilkara huberi* (Ducke) Chev. Sapotaceae**. 2007. 202 f. Tese (Doutorado) Universidade de Brasília/UNB, Brasília, 2007.
- AZEVEDO, V. C. R.; SUJII, P. S.; CIAMPI, A. Y. Desenvolvimento e otimização de marcadores microssatélites de castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa*). In: 54º Congresso Brasileiro de Genética, Salvador, Bahia, Brasil. **Anais...SBG**, p.87, 2008.
- BUCKLEY, D. P.; O'MALLEY, D. M.; APSIT, V.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 923-928, 1988.
- CAVALCANTE, M. C.; OLIVEIRA, F. F.; MAUÉS, M. M.; FREITAS, B. M. Pollination requirements and the foraging behavior of potential pollinators of cultivated Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Bonpl.) trees in Central Amazon Rainforest. **Psyche: A Journal of Entomology**, v. 2012, p. 1-9, 2012.
- CLOUTIER, D.; KANASHIRO, M.; CIAMPI, A. Y.; SCHOEN, D. J. Impact of selective logging on inbreeding and gene dispersal in Amazonia tree population of *Carapa guianensis* Aubl. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 797-809, 2006.
- CRESTE, S.; NETO, A. T.; FIGUEIRA, A. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver. **Plant Molecular Biology**, v. 19, p. 299-306, 2001.
- DON, R. H.; COX, P. T.; WAINWRIGHT, B. J.; BAKER, K.; MATTICK, J. S. Touchdown PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. **Nucleic Acids Research**, v. 19, p. 4008, 1991.
- DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v. 12, p. 13-15, 1987.
- EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2611-2620, 2005.
- GOUDET, J. FSTAT (vers. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485-486, 1995.
- GRIBEL, R.; LEMES, M. R.; BERNARDES, L. G.; PINTO, A. E.; JR SHEPARD, G. H. Phylogeography of Brazil-nut tree (*Bertholletia excelsa*, Lecythidaceae): Evidence of human influence on the species distribution. **Morelia: Association for Tropical Biology and Conservation**, Morelia, 2007.
- HAMRICK, J. Plant population genetics and evolution. **American Journal of Botany**, v. 69, p. 1685-1693, 1982.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da Extração Vegetal e da Silvicultura**: Ministério do Planejamento Orçamento e Gestão, 2013.
- KAGEYAMA, P. Y.; CARON, D.; GANDARA, F. B.; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; LACERDA, C. M. B.; BOUFLEUER, N. T.; RIBAS, L. A.; MORENO, M. A.; FERRAZ, E. M.; Genetic and ecological aspects of nonwood forest products exploitation in two western Amazonian settlements. In: VINCETI, B.; AMARAL, W.; MEILLEUR, B. (Org.) **Challenges in managing forest genetic resource for livelihoods: examples from Argentina and Brazil**. Roma: International Plant Genetic Resources Institute, 2004. p. 149-165.

- KAGEYAMA, P. Y.; GANDARA, F. B.; VENCOSKY, R. Conservação in situ de espécies arbóreas tropicais. In: NASS, L. L.; VALOIS, A. C. C.; MELO, I. S.; VALADARES-INGLIS, M. C. **Recursos genéticos e melhoramento - plantas**. Rondonópolis: Fundação MT, 2001. p.149-158.
- KAINER, K. A.; DURYEA, M. L.; MACEDO, N. C. DE.; WILLIAMS, K. Brazil nut seedling establishment and autecology in Extractive Reserves of Acre, Brazil. **Ecological Applications**, v.8, p. 397-410, 1998.
- KANASHIRO, M.; HARRIS, S. A.; SIMONS, A. RAPD Diversity in Brazil Nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl., Lecythidaceae). **Silvae Genetica**, v. 46, p. 219-223, 1997.
- LACERDA, A. E.; KANASHIRO, M.; SEBBENN, A. M. Effects of Reduced Impact Logging on genetic diversity and spatial genetic structure of a *Hymenaea courbaril* population in the Brazilian Amazon Forest. **Forest Ecology and Management**, v. 255, p. 1034-1043, 2008.
- LEWIS, P. O.; ZAYKIN, D. (2000) Genetic Data Analysis: Computer program for the analysis of allelic data. 2000. Disponível em <http://en.bio-soft.net/dna/gda.html>, 2000.
- MAUÉS, M. M. Reproductive phenology and pollination of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. Lecythidaceae) in Eastern Amazonia. In: KEVAN, P.; IMPERATRIZ FONSECA, V. L. (Ed.). **Pollinating bees - the conservation link between agriculture and nature**. Ministry of the Environment, Brasília, 2002. p. 245-254.
- MILLER, M. Tools for population genetics analyses (TFPGA): a Windows program for analyses of allozyme and molecular population genetic data. Version 1.3. Disponível em <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>, 1997.
- MILLIGAN, G. W.; COOPER, M. C. An examination of procedures for determining the number of clusters in a data set. **Psychometrika**, v. 50, p. 159-179, 1985.
- MOJENA, R. Hierarchical grouping method and stopping rules: an evaluation. **Computer Journal**, v. 20, p. 359-363, 1977.
- MORI, S. A.; PRANCE, G. T. Taxonomy, ecology and economic botany of the Brazil nut (*Bertholletia excelsa*, Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Advances in Economic Botany**, v. 8, p. 130-150, 1990.
- MORITZ, A. Estudos biológicos da floração e da frutificação da castanha-do-brasil (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae), EMBRAPA-CPATU, Documentos, 1984.
- NEI, M. Estimation of average of heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 49, p. 583-590, 1978.
- OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCOSKY, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p. 294-307, 2006.
- O'MALLEY, D. M.; BUCKLEY, D. P.; PRANCE, G. T.; BAWA, K. S. Genetics of Brazil nut (*Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl.: Lecythidaceae). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 76, p. 929-932, 1988.
- PARDO, M. **Estrutura genética de castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa* H.B.K.) em floresta e em pastagens no leste do estado do Acre**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado) Universidade de São Paulo, USP, Piracicaba, 2001.
- PRANCE, G. T.; MORI, A. S. Lecythidaceae - Part I: The actinomorphic flowered New World Lecythidaceae. **Flora Neotropica**, v. 21, p. 1-270, 1979.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- SEBBENN, A. M.; CARVALHO, A. C. M.; FREITAS, M. L. M.; MORAES, S. M. B.; GAINO, A. P. S. C.; DA SILVA, J. M.; JOLIVET, C.; MORAES, M. L. T. Low levels of realized seed and pollen gene flow and strong spatial genetic structure in a small, isolated and fragmented population of the tropical tree *Copaifera langsdorffii* Desf. **Heredity**, v.106, p. 134-145, 2011.
- SILVA, A. C. C. **Remoção e destino de sementes de *Carapa guianensis* Aubl. (Meliaceae) e *Bertholletia excelsa* Bonpl. (Lecythidaceae) no sudoeste do estado do Acre, Brasil**. 2009. 153 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Acre/UFAC, Rio Branco, 2009.
- SUJII, P. S.; MARTINS, K.; WADT, L. H. O.; AZEVEDO, V. C. R.; SOLFERINI, V. N. Genetic structure of *Bertholletia excelsa* populations from the Amazon at different spatial scales. **Conservation Genetics**, v. 16, p. 955-964, 2015.
- REIS, A.; BRAGA, A.; LEMES, M.; GRIBEL, R.; COLLEVATTI, R. Development and characterization of microsatellite markers for the Brazil nut tree *Bertholletia excelsa* Humb. & Bonpl. (Lecythidaceae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 920-923, 2009.
- HAUGAASEN, J. M.; HAUGAASEN, T.; PERES, C. A.; GRIBEL, R.; WEGGE, P. Seed dispersal of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*) by scatter-hoarding rodents in a central Amazonian forest. **Journal of Tropical Ecology**, v. 26, p. 251-262, 2010.
- VAN OOSTERHOUT C.; HUTCHINSON WF; WILLS DPM.; SHIPLEY P. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 535-538, 2004.
- WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; GOMES-SILVA, D. A. P. Population structure and nut yield of a *Bertholletia excelsa* stand in Southwestern Amazonia. **Forest Ecology and Management**, v. 211, p. 371-384, 2005.
- WADT, L. H. O.; KAINER, K. A.; STAUDHAMMER, C.; SERRANO, R. Sustainable forest use in Brazilian extractive reserves: Natural regeneration of Brazil nut in exploited populations. **Biological Conservation**, v.141, p. 332-346, 2008.
- WADT, L. H. O.; BALDONI, A. B.; SILVA, V. S.; CAMPOS, T.; MARTINS, K.; AZEVEDO, V. C. R.; MATA, L. R.; BOTIN, A. A.; HOOGERHEIDE, E. S. S.; TONINI, H.; SEBBENN, A. M. Mating system variation among populations, individuals and within and among fruits in *Bertholletia excelsa*. **Silvae Genetica**, v. 64, p. 248-259, 2015.
- WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, p. 1358-1370, 1984.
- ZUIDEMA, P. A. **Ecology and management of the Brazil nut tree (*Bertholletia excelsa*)**. PROMAB (Programa Manejo de Bosques de la Amazonia Boliviana), Scientific Series 6, Riberalta, Bolivia, 2003.